مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۰، شماره ۲، تابستان ۸۹، صفحات ۹۰ تا ۹۷

Original Article

بررسی بیان ژن پروتئین Opticin در رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی

زهرا طهماسبی فرد[۱]، کاظم پریور[۲]، حجت اله ربانی[۳]، محمود جدی تهرانی[۳]، شیدا همتی[۴]

[۱] مربی، دانشجوی دکترای سلولی- مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران
[۲] استاد، دکترای زیست شناسی علوم جانوری گرایش سلولی- تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران
[۳] دانشیار، دکترای ایمونولوژی، پژوهشکده آنتی‌بادی منوکلونال، پژوهشگاه فن آوری های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی- ابن سینا
[۴] کارشناس ارشد سلولی و مولکولی، پژوهشکده آنتی‌بادی منوکلونال، پژوهشگاه فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی- ابن سینا

چکیده

سابقه و هدف: *Opticin از دسته پروتئوگلایکان‌های کوچک غنی از لوسین عمدتاً در چشم انسان یافت می‌شود. همچنین opticin در سطوح پایینی نسبت به چشم، در بافت‌های طبیعی مغز، غضروف، کبد و پوست نیز شناسایی شده است. در این مطالعه، بیان opticin در رده‌های سلول‌های سرطانی انسان بررسی شد.*

روش بررسی: *در این پژوهش بنیادی، رده‌های سلول‌های سرطانی انسان شامل رده سلول A-172 (سرطان مغز)، رده سلول T47D (سرطان غدد پستانی)، رده سلول Paca-2 (سرطان پانکراس)، رده سلول Ej-138 (سرطان مثانه)، رده سلول Calu6 (سرطان ریه)، رده سلول ACHN (سرطان کلیه)، رده سلول SKOV3 (سرطان تخمدان)، رده سلول LS-180 (سرطان روده بزرگ)، رده سلول A-375 (سرطان پوست)، رده سلول PC3 (سرطان پروستات) و رده سلول CLL-CII (سرطان لوسمی لنفوسیتی مزمن) با دو روش RT-PCR و Western blot برای بیان و حضور پروتئین opticin مورد بررسی قرار گرفتند.*

یافته‌ها: *همه رده‌های سلول‌های سرطانی به جز A-172 در هر دو سطح mRNA و پروتئین، opticin را بیان کردند.*

نتیجه‌گیری: *در مطالعه حاضر، رده‌های سلول‌های سرطانی انسان، بیان opticin را نشان دادند، در حالی که گزارشات قبلی حاکی از عدم بیان opticin در بافت‌های طبیعی متناظر آنها بود. این پروتئین را می‌توان بعنوان یک مارکر سرطانی در نظر گرفت و تحقیقات آینده می‌تواند بیشتر در زمینه بررسی عملکرد این پروتئین در سرطان‌زایی معطوف گردد.*

واژگان کلیدی: *بیان opticin، رده‌های سلول سرطانی،آنتی بادی پلی کلونال انسانی(OPTC-N).*

مقدمه

ماتریکس برون سلولی (ECM: Extra Cellular Matrix)، مخزنی از پروتئین‌های متصل شونده به سلول و فاکتورهای رشد است که بر رفتار سلول سرطانی تاثیر می‌گذارد (۱). یک خانواده از این مولکول‌ها که اعمال متعددی از جمله تنظیم شکل‌گیری ماتریکس، اتصال فاکتورهای رشد و مهار رشد سلول را بر عهده دارند، پروتئین‌های ماتریکس برون سلولی بوده که دارای توالی‌های تکراری کوچک غنی از لوسین (SLRPs) با سکانس حفظ شده LXXLXLXXNXL می‌باشند (۲، ۳) که در این سکانس X هر آمینواسید، L لوسین، ایزولوسین یا والین و N می‌تواند آسپارژین، سیستئین یا ترئونین باشد (۳). امروزه ده عضو از این خانواده SLRPs شناسایی شده است (۲، ۴) که در سه کلاس بسته به تعداد تکرارهای غنی از لوسین، فاصله چهار جزء سیستئین موجود در بخش آمینوترمینال و تعداد اگزون‌های کد کننده ژن تقسیم‌بندی می‌شوند. کلاس I و II از SLRPها دارای حدود 12LRRs بوده، در حالی که اعضاء کلاس III نظیرOpticin،

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، زهرا طهماسبی فرد (email: zahran26@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۳/۲
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/۶/۲۱

Epiphycan/PG-Lb و Osteoglycin/mimeca دارای حدود 7LRRs می‌باشند (۳).

Opticin یک گلیکوپروتئین ماتریکس برون سلولی است که اولین بار در سال ۲۰۰۰ در ارتباط با فیبریل‌های کلاژن زجاجیه چشم شناسایی شد. opticin یا oculoglycan تشابه سکانسی بالایی در ناحیه LRR با دو عضو دیگر این کلاس Epiphycan و Osteoglycin/mimecan دارد. SLRPهای متعلق به کلاس III دارای یک ناحیه متشکل از ۸ تکرار LRR، با دو و یک جفت باند دی‌سولفیدی سیستئینی به ترتیب در دو انتهای آمینوترمینال و کربوکسی ترمینال پروتئین می‌باشند (۵).

opticin بر روی بازوی بلند کروموزوم یک در ناحیه ۳۱-۳۲ (chromosome 1q31-32) قرار داشته و یک رونوشت ۱/۶ کیلو باز از آن در چشم شناسایی شده است. چارچوب خواندنی باز ([open reading frame [ORF) آن ۹۹۶ جفت باز طول داشته و از ۳۳۲ آمینواسید تشکیل شده است (۶). این پروتئین بر خلاف سایر SLRPها که از زنجیره‌های گلیکوزآمینوگلایکان تشکیل شده‌اند، دارای الیگوساکاریدهای O-Linked سیالیله در بخش آمینو ترمینال می‌باشد(۷). وزن مولکولی این پروتئین از ۳۵ تا ۴۵ کیلودالتون متغیر است. اختلاف در وزن مولکولی بخاطر گلیکوزیلاسیون و یا تغییرات بعد از ترجمه می‌باشد (۸).

مولکول opticin دارای سیگنال پپتید ۱۹ آمینواسیدی و دو ناحیه ساختاری است که یکی از آنها دارای شش تکرار غنی از لوسین می‌باشد. این ناحیه با تکرارهای متغیر، قدرت اتصال به سایر مولکول‌ها را دارد. بعلاوه در بخش آمینوترمینال پروتئین مجموعه‌ای از محلهای o–گلیکوزیلاسیون وجود دارد که یک خصوصیت منحصر به opticin در بین پروتئینهای برون سلولی LRR به حساب می‌آید (۸).

در خصوص اعمال opticin اطلاعاتی موجود نمی‌باشد. تنها عملی که در مورد آن تاکنون شناخته شده، این است که به چندین فاکتور رشد متصل شده (۷، ۸) و تکامل و تمایز سلولها را کنترل می‌کند (۸).

در مطالعه حاضر بیان mRNA و پروتئین opticin در رده‌های سلول‌های سرطانی گرفته شده از بافت‌های مختلف انسان، بررسی شد. بعلاوه از پروتئین نوترکیب opticin تولید شده درسلول *Pichia pastoris* سوش SMD1168H (بخشی از تحقیق دیگر انجام شده در پژوهشگاه ابن‌سینا می‌باشد) برای اطمینان از عملکرد آنتی‌بادی‌ها در شناسایی پروتئین opticin استفاده شد.

مواد و روشها

در مطالعه بنیادی حاضر، برای کشت سلول‌ها، رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی شامل رده سلول A-172 (سرطان مغز)، رده سلول Paca-2 (سرطان پانکراس انسان)، رده سلول Ej-138 (سرطان مثانه)، رده سلول Calu6 (سرطان ریه)، رده سلول ACHN (سرطان کلیه)، رده سلول SKOV3 (سرطان تخمدان)، رده سلول LS-180 (سرطان روده بزرگ)، رده سلول A-375 (سرطان پوست) و رده سلول PC3 (سرطان پروستات) از بخش بانک سلولی انیستیتو پاستور ایران و رده سلول T47D (سرطان غدد پستانی) و رده سلول CLL-CII (سرطان لوسمی لنفوسیتی مزمن) از ATCC (American Type Culture Collection) خریداری شده و در محیط حاوی RPMI 1640 (sigma) با ۱۰ درصد FBS (Fetal Bovine Serum) وآنتی‌بیوتیک‌ها (پنی‌سیلین (۱۰۰ U/ml) و استرپتومایسین (۱۰۰ µg/ml) کشت داده شدند. همه سلول‌ها تا زمانی که به ۷۰ تا ۸۰ درصد از مرحله رشد مورد نظر برسند، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با CO2 ۵ درصد انکوبه شدند. سپس سلول‌ها دو بار با بافر سالین فسفات PBS 1X شستشو داده شدند تا سلول‌های مرده جدا شوند. سلول‌های باقی‌مانده به کمک محیط تریپسین حاوی EDTA ۰/۱درصد (sigma-Aldrich corp.saint.Louis.Mo,USA) از فلاسک جدا شده و درصد سلول‌های زنده به کمک تریپان‌بلو اندازه‌گیری شدند (بیش از ۸۰ درصد). این سلول‌ها با دور ۴۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و برای تهیه لیزات سلولی و استخراج RNA تام مورد استفاده قرار گرفتند.

برای تکثیر opticin با روش RT-PCR، RNA تام از رده‌های مختلف سلولی با استفاده از محلول RNA Bee (TEL Test Friedswood,Tx. USA) مطابق دستور کار شرکت استخراج شد. ابتدا برای باز شدن تاخوردگی‌های RNA، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس برای تهیه cDNA، ۱۰ میکرولیتر از RNA تام با غلظت ۱ میکروگرم در یک واکنش با حجم ۲۰ میکرولیتر [(۴ میکرولیتر از بافر ۵X (Roche, Diagnostics, Mannheim, Germany) و ۲ میکرولیتر از dNTP ۱۰ میلی‌مولار (Roche)، ۱ میکرولیتر از random hexamer (N6) ۱۰ پیکومول (Roche)، ۱ میکرولیتر از آنزیم نسخه‌برداری معکوس M-MuLV (Roche) و ۲ میکرولیتر از H20)] استفاده شد. مخلوط واکنش‌ها در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱ ساعت و سپس ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه انکوبه شدند.

برای اطمینان از درستی سنتز، نمونه‌ها با پرایمرهای اختصاصی بتااکتین S: 5′ TCGTAGATGGGCAC AGTGTGGGTG3′ و AS: 5′ CGCGAGAAGA TGAC 3′ CCAGATCATG با مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتری (۲/۵ میکرولیتر از بافر ۱۰X (Roche)، ۱/۵ میکرولیتر از MgCl2 ۲۵ میلی مولار (Roche)، ۱ میکرولیتر از dNTP ۱۰ میلی‌مولار (Roche)، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر S ۱۰ پیکومول (operon,Koln,Germany)، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر AS ۱۰ پیکومول(operon)، ۰/۱ میکرولیتر از آنزیم Taq پلیمراز (Roche)، ۱۷/۹ میکرولیتر از H20 و ۱ میکرولیتر از نمونهcDNA) بررسی شدند و با برنامه ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای یک نوبت ۳ دقیقه، ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۷ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه در ۳۰ سیکل و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۷ دقیقه در یک سیکل برای تکثیر قطعه ۱۵۵ bp از بتا اکتین، در دستگاه ترموسایکر Eppendorf Mastercycler gradiant, (Germany) قرار داده شد. محصولات تکثیر شده بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ حاوی اتیدیوم بروماید در کنار سایز مارکر VIII (Roche) الکتروفورز شدند تا باندهای مورد نظر مشاهده شوند. تکثیر ۱۰۰۰ جفت بازی قطعه opticin، با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی آن شامل پرایمر S:5′GCCACCATGGGGCTCCTGGCTTTCCTG3′ و AS: 5′ TCGTGAAGCGGCCGATGG 3′ انجام گرفت. مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتری (۲/۵ میکرولیتر از بافر ۱۰X (Roche)، ۲/۵ میکرولیتر از MgCl2 ۲۵ میلی‌مولار (Roche)، ۱/۵ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار (Roche)، ۱ میکرولیتر از پرایمر S ۱۰ پیکومول (operon)، ۱ میکرولیتر از پرایمر AS ۱۰ پیکومول، ۰/۲میکرولیتر از آنزیم Taq پلیمراز (Roche)، ۱۵/۳ میکرولیتر از H2O و ۱ میکرولیتری از نمونه cDNA) تهیه شد وبا برنامه ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه سپس ۳۵ سیکل ^{o}C ۹۴ برای ۳۰ ثانیه ، ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و در پایان یک سیکل ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۷ دقیقه در دستگاه PCR قرار داده شد. محصول تکثیر شده بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد.

همان‌گونه که در مطالعات قبلی (۶) ایزوفرم‌های متفاوتی از ژن opticin شناسایی شده بود، در تحقیق حاضر نیز برای تکثیر این اشکال، جفت پرایمر دیگری طراحی شد تا mRNAهای حاصل از پردازش‌های متفاوت بر روی رونوشت اولیه را شناسایی کند. پرایمر S: 5′ CCCAAGGAAGGAGAGGAAGAGGA 3′ و AS: 5′ GAAATGAGGTTGTTGGAGAGGTC 3′ طراحی شده قادر به تکثیر قطعه ۵۰۴ جفت بازی از ژن opticin می‌باشد. برای هر نمونه مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتری (۲/۵ میکرولیتر از بافر ۱۰X (Roche)، ۲/۵ میکرولیتر از MgCl2 ۲۵ میلی‌مولار (Roche) ، ۱/۵ میکرولیتر از dNTP ۱۰ میلی‌مولار (Roche)، ۱ میکرولیتر از پرایمر S ۱۰ پیکومول (operon)، ۱ میکرولیتر از پرایمر ۱۰ پیکومول (operon) ۰/۲ میکرولیتر از آنزیم Taq پلیمراز (Roche)، ۱۵/۳ میکرولیتر H2O و ۱ میکرولیتر از نمونه cDNA) تهیه شد تا یک سیکل در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه و ۳۵ سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه وسپس در انتها ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۷ دقیقه در دستگاه PCR قرار داده شود. محصول تکثیر شده برای هر نمونه بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد تا باندها در مقایسه با سایز مارکر مشاهده شوند.

دو آنتی‌بادی پلی‌کلونال بر علیه پپتید opticin در دو خرگوش در پژوهشگاه ابن‌سینا تولید شد. آنتی‌سرم OPTC-N بر علیه پپتید سنتز شده (MRLLAFLSLLALVLQETGT) مطابق با سکانسی در بخش انتهای آمینی پروتئین opticin انسانی است و آنتی‌سرم OPTC-C بر علیه پپتید سنتز شده (CDPEEHKHTRRQ) مطابق با سکانسی از بخش انتهای کربوکسی پروتئین opticin انسانی می‌باشد.

در روش Western blot، سلول‌ها پس از دو بار شستشو دادن با PBS 1X به کمک تکنیک تریپان بلو شمارش شدند. به ازاء هر ۵×۱۰^{۶} سلول ml ۱ از بافر لیز کننده RIPA (abcam,cambridge,UK) و ۱٪ مهارکننده پروتئازها (Sigma) به هر میکروتیوپ افزوده شد. سلول‌ها در طی مدت ۲۰ دقیقه پس از قرارگیری در محیط حاوی بافر لیزکننده، بطور کامل لیز شده و به کمک کیت BCA (Thermo,pierce,USA) مطابق دستور کار شرکت، لیزات سلول‌ها تعیین غلظت شدند.

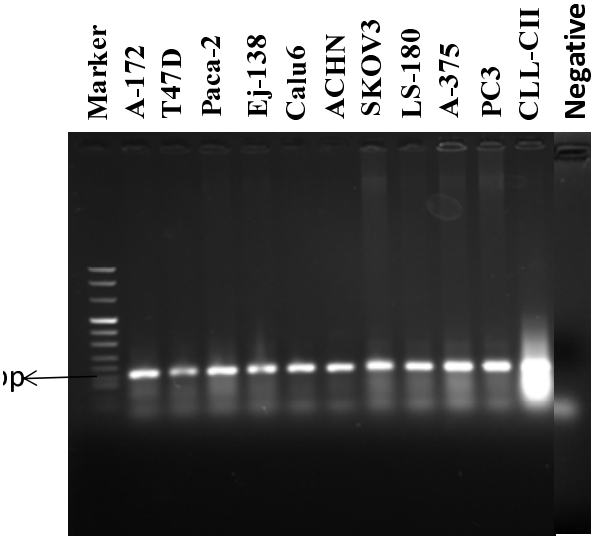
لیزات سلول‌ها به میزان ۶۰ میکروگرم در هر چاهک، FBS و پروتئین نوترکیب تخلیص شده با غلظت ۵ میکروگرم در هر چاهک، بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۰٪ در شرایط بدون احیاء شدن الکتروفورز شدند. سپس پروتئین‌های الکتروفورز شده به کاغذ PVDF (Polyvinylidene Fluoride) منتقل شده و به مدت یک شب در شیر خشک بدون چربی (Non-fat dry milk) با بافر PBS به همراه ۰/۰۵ ٪ Tween (Sigma)

20 (PBS-T) قرار داده شد تا نواحی غیراختصاصی پوشانده شود و به کمک آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال تولید شده بر علیه پپتید OPTC-N و OPTC-C مورد بررسی قرار گیرند. کاغذ PVDF بمدت ۱/۵ ساعت با آنتی‌بادی پلی‌کلونال اولیه با غلظت ۱۰ میکروگرم در میکرولیتر به همراه PBS-T بر روی شیکر قرار گرفت. پس از گذشت مدت زمان لازم، با PBS-T یک بار به مدت ۲۰ دقیقه و سه بار به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شد. سپس آنتی‌بادی ثانویه HRP-Sheep anti rabbit (Horseradish peroxidase) (پژوهشگاه ابن سینا) که بر علیه آنتی‌بادی اولیه می باشد، با غلظت ۱ به ۱۵۰۰ میکرولیتر به مدت ۱/۵ ساعت به همراه PBS-T بر روی شیکر قرار گرفت. در انتها عمل شستشو مطابق مرحله قبل تکرار شد. در نهایت با افزودن سوبسترا کمی لومینسانس ECL (GE Health care, Uppsala, Sweden) به کاغذ PVDF، حضور opticin در نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

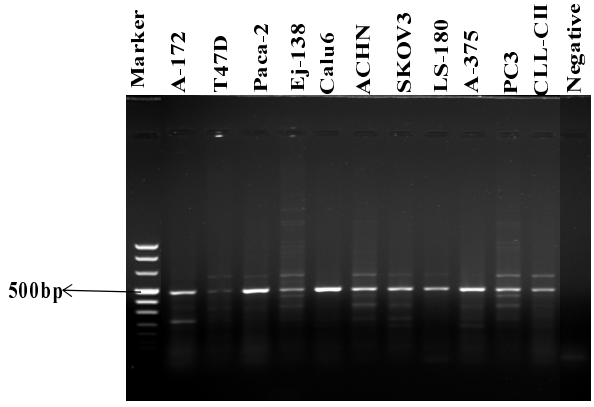
در بررسی cDNA سلول‌ها، نمونه‌های مناسب برای PCR با استفاده از تکثیر ژن Housekeeping بتااکتین انتخاب می‌شدند. تکثیر موفقیت آمیز ژن بتااکتین نشان داد که آن نمونه مناسب برای PCR ژن می‌باشد. محصولات PCR مربوط به تکثیر قطعه بتااکتین با پرایمرهای اختصاصی به اندازه ۱۰ میکرولیتر بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ لود شدند. همان طور که انتظار می‌رفت، قطعه ۱۵۵ bp در مقایسه با سایز مارکر VIII (Roche) مشهود بود (شکل ۱).

در بررسی بیان ژن opticin، پس از اطمینان از تکثیر قطعه ژن Housekeeping بتااکتین، تکثیر قطعه opticin در نمونه‌ها با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام گرفت. ایزوفرم‌های متفاوت شناخته شده از این ژن، به کمک جفت پرایمر اختصاصی تکثیر شدند. سپس محصولات PCR برای هر نمونه به اندازه ۱۰ میکرولیتر ،بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ الکتروفورز شد تا قطعه مورد نظر (۵۰۴ جفت بازی) در کنار سایز مارکر مشاهده شود (شکل ۲). نتیجه حاصل از تکثیر ایزوفرمهای متفاوت opticin نشان می‌دهد که غیر از سلول T47D که باند ضعیفی را مشاهده می‌شود، در مورد سایر سلولها، باند مورد نظر که ۵۰۴bp می‌باشد، قابل شناسایی است.



شکل ۱- محصولات RT-PCR برای قطعه ای از ژن بتا اکتین که بر روی ژل آگاروز۱/۵ ٪ لود شده است.

از چپ به راست: سایز مارکرVIII (Roche) ، سلول A-172 (سرطان مغز)، سلول T47D (سرطان غدد پستانی)، سلول Paca-2 (سرطان پانکراس انسان)، سلول Ej-138 (سرطان مثانه)، سلول Calu6 (سرطان ریه)، سلول ACHN (سرطان کلیه)، سلول SKOV3 (سرطان تخمدان)، سلول LS-180 (سرطان روده بزرگ)، سلول A-375 (سرطان پوست)، سلول PC3 (سرطان پروستات)، سلول CLL-CII (سرطان لوسمی لنفوسیتی مزمن) و کنترل منفی

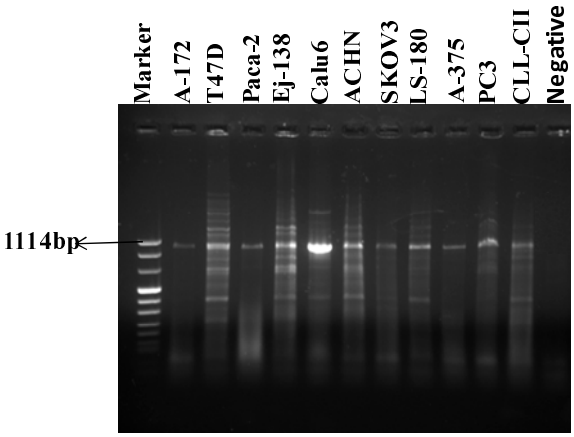


شکل ۲- محصولات RT-PCR حاصل از تکثیر قطعهء ۵۰۴ bp از ژن opticin برای شناسایی ایزوفرمهای متفاوت آن می باشد.

از چپ به راست: سایز مارکرVIII (Roche)، سلول A-172 (سرطان مغز)، سلول T47D (سرطان غدد پستانی)، سلول Paca-2 (سرطان پانکراس انسان)، سلول Ej-138 (سرطان مثانه)، سلول Calu6 (سرطان ریه)، سلول ACHN (سرطان کلیه)، سلول SKOV3 (سرطان تخمدان)، سلول LS-180 (سرطان روده بزرگ)، سلول A-375 (سرطان پوست)، سلول PC3 (سرطان پروستات)، سلول-CLL CII (سرطان لوسمی لنفوسیتی مزمن) و کنترل منفی

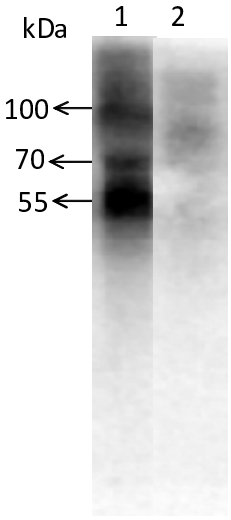
برای شناسایی رونوشت‌های حاوی طول کامل قطعه opticin، مجدداً cDNAهای سلول‌ها با جفت پرایمر دیگر که منجر به تولید محصولاتی به طول ۱۰۰۰bp می‌شد، بررسی شدند. ۱۰ میکرولیتر از محصولات تکثیر یافته بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪

الکتروفورز شدند (شکل ۳). نتایج این بررسی هم تایید کننده بیان ژن opticin در رده های مختلف سلول‌های سرطانی بود. در مقایسه با سایز مارکر، قطعه bp ۱۰۰۰ از محصولات تکثیر یافته قابل شناسایی است.



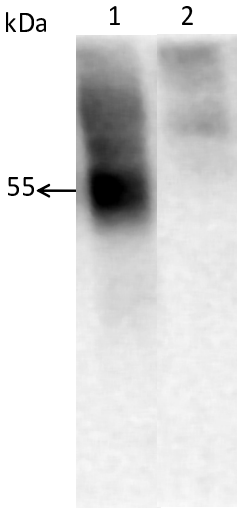
شکل ۳- محصولات RT-PCR حاصل از تکثیر طول کامل قطعه opticin به طول bp ۱۰۰۰ می باشد.

از چپ به راست: سایز مارکرVIII (Roche)، سلول A-172 (سرطان مغز)، سلول T47D (سرطان غدد پستانی)، سلول Paca-2 (سرطان پانکراس انسان)، سلول Ej-138 (سرطان مثانه)، سلول Calu6 (سرطان ریه)، سلول ACHN (سرطان کلیه)، سلول SKOV3 (سرطان تخمدان)، سلول LS-180 (سرطان روده بزرگ)، سلول A-375 (سرطان پوست)، سلول PC3 (سرطان پروستات)، سلول-CLL CII (سرطان لوسمی لنفوسیتی مزمن) و کنترل منفی



شکل ۴- بررسی عملکرد آنتی‌بادی پلی‌کلونال OPTC-C بر روی لیزات سلول مخمر. شماره ۱: لیزات نمونه مخمر بیان کننده پروتئین نوترکیب opticin؛ شماره ۲: لیزات نمونه مخمر نرمال که قدرت بیان پروتئین نوترکیب را ندارد.

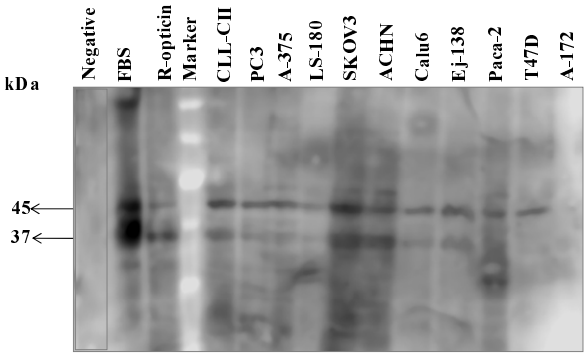
در بررسی بیان opticin در سطح پروتئین، روش دیگر برای تایید بیان این پروتئین در سلول‌های مختلف، استفاده از تکنیک وسترن بلات می‌باشد. برای انجام این تست، از دو آنتی‌بادی پلی‌کلونال تولید شده بر علیه دو پپتید طراحی شده مطابق با توالی آمینوترمینال (OPTC-N) وکربوکسی ترمینال (OPTC-C) پروتئین opticin انسانی، استفاده شد. برای اطمینان از شناسایی پروتئین توسط این آنتی‌بادی‌ها، آزمون وسترن بلات جهت تشخیص سلول مخمر تولید کننده این پروتئین و سلول مخمر نرمال از همان نوع که قادر به تولید این پروتئین نمی‌باشد، انجام گرفت. لیزات سلولهای مخمری در شرایط غیراحیاء با این آنتی‌بادی‌ها تست شدند. در شکل ۴ لیزات تهیه از سلول مخمربیان کننده پروتئین نوترکیب opticin انسانی با آنتی‌بادی پلی‌کلونال OPTC_C مورد بررسی قرار گرفته و سه باند ۵۵ و ۷۰ و بیش از ۹۰ کیلودالتون مشاهده می‌شود که نشان دهنده گلیکوزیلاسیون متعدد بر روی پروتئین است. در شکل ۵ که همین نمونه‌ها در شرایط غیراحیاء با آنتی‌بادی پلی‌کلونال OPTC-N بررسی شدند و تنها یک باند در محدوده ۵۵ کیلودالتونی مشاهده شد.



شکل ۵- بررسی عملکرد آنتی بادی پلی کلونال OPTC-N بر روی لیزات سلول مخمر. شماره ۱: لیزات نمونه مخمر بیان کننده پروتئین نوترکیب opticin؛ شماره ۲: لیزات نمونه مخمر نرمال که قدرت بیان پروتئین نوترکیب را ندارد.

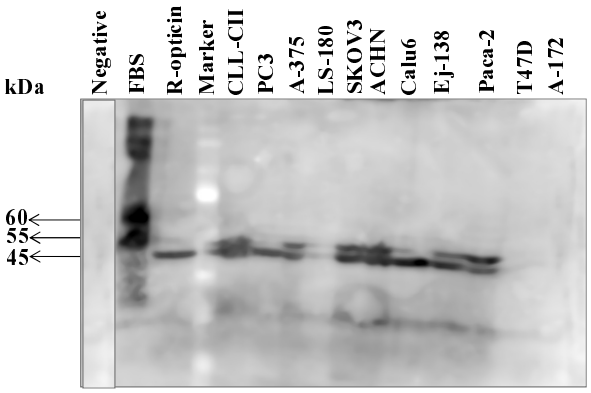
پس از تایید صحت عملکرد آنتی‌بادی، لیزات سلول‌ها در شرایط غیراحیاء با آنتی‌بادی پلی‌کلونال OPTC-C بررسی شدند. نتایج نشان دهنده حضور پروتئین opticin در دو وزن مولکولی ۳۷ و۴۵ کیلودالتون بود. این نتیجه مطابق گزارشات قبلی از وزن مولکولی این پروتئین است (۱۰). در بررسی لیزات‌های مختلف سلولی مشاهده می‌شود که باند ۴۵

کیلودالتونی در تمامی نمونه‌ها به جز نمونه سلول A-172 و باند ۳۷ کیلودالتونی به جز نمونه‌های T47D و A172 قابل شناسایی است. برای کنترل منفی از پروتئین نوترکیب opticin (تخلیص شده با ستون افینیتی آنتی‌بادی از لیزات سلولهای مخمر بیان کننده پروتئین) بدون اثر آنتی‌بادی پلی‌کلونال اولیه استفاده شد و سایر مراحل آزمایش مشابه نمونه‌ها تکرار شد (شکل ۶).



شکل ۶- شناسایی پروتئین opticin در لیزات سلولهای سرطانی به کمک تکنیک وسترن‌بلات با آنتی بادی پلی کلونال OPTC –C که بخش کربوکسی ترمینال پروتئین opticin را شناسایی می‌کند.
از راست به چپ: سلول A-172 (سرطان مغز)، سلول T47D (سرطان غدد پستانی)، سلول Paca-2 (سرطان پانکراس انسان)، سلول Ej-138 (سرطان مثانه)، سلول Calu6 (سرطان ریه)، سلول ACHN (سرطان کلیه)، سلول SKOV3 (سرطان تخمدان)، سلول LS-180 (سرطان روده بزرگ)، سلول A-375 (سرطان پوست)، سلول PC3 (سرطان پروستات)، سلول CLL-CII (سرطان لوسمی لنفوسیتی مزمن)، مارکر پروتئینی، پروتئین نوترکیب تخلیص شده از سلول مخمر، سرم جنین گاو، کنترل منفی

نمونه‌های لیزات سلولی مجدداً در شرایط غیراحیاء با آنتی‌بادی پلی‌کلونال OPTC-N بررسی شدند (شکل ۷). این آنتی‌بادی قادر به شناسایی بخش سیگنال پروتئین می‌باشد. پروتئین opticin گاوی با وزن مولکولی ۵۵ و۶۰ کیلودالتونی (در رفرنس شماره ۳ نیز در همین محدوده پروتئین opticin. گاوی شناسایی شده است) و پروتئین نوترکیب مخمری با وزن مولکولی ۴۵ کیلودالتونی قابل شناسایی است. در نمونه‌های CLL-CII, A-375, Skov3, ACHN, Ej-138, Paca-2 پروتئین opticin بصورت دایمر در محدوده ۴۵ کیلودالتونی دیده می‌شود. دایمر شدن پروتئین در گزارشات قبلی نیز مشاهده شده است (۱۱). از بین نمونه‌های سرطانی، سلول T47D پروتئین نابالغ opticin را نشان نداد و در مورد سلول A-172 نیز هیچ باندی مشاهده نشد. کنترل منفی فاقد لایه اول (آنتی‌بادی پلی‌کلونالOPTC-N) بود.



شکل ۷- شناسایی پروتئین opticin در لیزات سلولهای سرطانی به کمک تکنیک وسترن بلات با آنتی بادی پلی کلونال OPTC –N که بخش سیگنال پروتئین opticin را شناسایی می کند.
از راست به چپ: سلول A-172 (سرطان مغز)، سلول T47D (سرطان غدد پستانی)، سلول Paca-2 (سرطان پانکراس انسان)، سلول Ej-138 (سرطان مثانه)، سلول Calu6 (سرطان ریه)، سلول ACHN (سرطان کلیه)، سلول SKOV3 (سرطان تخمدان)، سلول LS-180 (سرطان روده بزرگ)، سلول A-375 (سرطان پوست)، سلول **PC3** (سرطان پروستات)، سلول CLL-CII (سرطان لوسمی لنفوسیتی مزمن)، مارکر پروتئینی، پروتئین نوترکیب تخلیص شده از سلول مخمر، سرم جنین گاو، کنترل منفی

بحث

Opticin یا optc یکی از پروتئین‌های ماتریکس برون سلولی و از خانواده LRR می‌باشد که اولین بار در سال ۲۰۰۰ از زجاجیه چشم گاو جدا شد، به همین خاطر نام آن از کلمه optic گرفته شده است (۴). پروتئین Opticin بخاطر داشتن توالی‌های تکراری از ناحیه LRR قادر به اتصال به مولکول‌های دیگر از جمله کلاژن موجود در ماتریکس برون سلولی و هورمونهای رشد می‌باشد. عمل دقیق این پروتئین ناشناخته است، ولی تصور می‌شود که در رشد، تمایز و تکثیر سلولی دخالت داشته باشد (۱۱).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۰ با تکنیک نورترن بلات بر روی RNA استخراج شده از بافتهای مختلف انسان انجام گرفت، مشخص شد که تنها در بافت چشم RNA مربوط به oculoglycan یا opticin وجود دارد (۹). در همان سال تحقیقات انجام شده با تکنیک RT-PCR و Western Blot نشان داد که علاوه بر چشم، در سطوح پایینی از بافت‌های مغز، غضروف، کبد و پوست انسان نیز بیان می‌شود (۴، ۱۰).

در مطالعه حاضر با تکنیک RT-PCR تکثیر opticin با دو جفت پرایمر اختصاصیش مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه آنها نشان داد که همه سلول‌ها به میزان متغیری از رونوشت opticin را بیان می‌کنند. همین نمونه‌ها با تکنیک

وسترن‌بلات و با دو آنتی‌بادی پلی‌کلونال بصورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفتند. تنها در مورد رده سلولی مشتق از سرطان مغز (A-172)، باند ضعیفی ازتکثیر ژن opticin دیده می‌شود، در حالی که در سطح پروتئین، بیانی از آن مشاهده نمی‌شود که می‌تواند بخاطر در معرض نبودن آن محل برای اتصال آنتی‌بادی پلی‌کلونال باشد. از بین رده‌های دیگر سلولی، رده سلولی سرطان ریه در سطح RNA و پروتئین بیان بالایی را نشان می‌دهد که در تحقیقات قبلی از بافت طبیعی آن گزارشی ارائه نشده است.

اوزان مولکولی بدست آمده با تکنیک وسترن بلات برای پروتئین opticin گاوی (موجود در FBS) با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال، مطابق با گزارشات قبلی در این زمینه است (۱۱). سایزهای مختلف مولکولی احتمالاً بخاطر گلیکوزیلاسیون متعدد و یا تغییرات پس از ترجمه متعدد حاصل می‌شود. آزمایشات وسترن بلات برای نمونه‌های سلولی با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال، نشان دهنده باند اختصاصی opticin در سایز ۳۷ و ۴۵ کیلودالتون است که با گزارشات قبلی در این زمینه مطابقت دارد (۷-۳). زیرا در بخش آمینوترمینال پروتئین opticin انسانی، محل‌های O-گلیکوزیلاسیون متعدد وجود دارد که سبب ایجاد اوزان مولکولی متفاوت می‌شود (۸).

در وسترن بلات انجام شده با OPTC-N اشکال دایمری از opticin مشاهده می‌شود که در رفرنس شماره ۵ نیز اشاره شده است. این پروتئین می‌تواند به کمک نواحی LRR و باندهای دی سولفیدی سیستئینی به شکل دایمر در آید (۱۱). Reardon و همکارانش در سال ۲۰۰۰، بیست و هشت بافت متفاوت از انسان بالغ و جنین را با RT-PCR مورد بررسی قرار دادند. یافته آنها بیانگر این بود که opticin در پوست، چشم و غضروف بیان می‌شود (۴). در بررسی حاضر، رده‌های سلول سرطانی از مغز، پانکراس، ریه، کلیه، تخمدان، پوست ،روده بزرگ، پروستات و لنفوسیت مورد بررسی قرار گرفت که قبلاً عدم وجود opticin در بافت طبیعی آنها توسط Reardon و همکارانش گزارش شده بود (۴). نتایج حاصل از تحقیق ما نشان داد که بجز در رده سلولی سرطان مغز، سایر سلول‌ها قادر به بیان opticin می‌باشند. ضمناً بیان opticin در دو رده سلولی سرطان غدد پستانی و مثانه که تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته بودند (۴)، در تحقیق حاضر بررسی شده و گزارش می‌شوند.

با توجه به نتایج فوق می توان opticin را به عنوان یک مارکر توموری جدید در نظر گرفت که در بیشتر سرطان‌ها بیان می‌شود. بیان این پروتئین در سلول‌های بدخیم نشان می‌دهد که این مولکول می‌تواند به عنوان یک هدف مناسب برای درمان سرطان در نظر گرفته شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی معاونت محترم تحقیقات و فناوری وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی و نیز با حمایت مالی پژوهشگاه ابن‌سینا انجام گرفته است. از ریاست محترم پژوهشگاه فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی- ابن سینا تهران و کلیه کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری دادند، تشکر و قدردانی می‌شود.

REFERENCES

1. DeClerck YA, Mercurio AM, Stack MSh, Chapman HA, Zutter MM, Muschel RJ, et al. Proteases, extracellular matrix, and cancer. Am J Pathol 2004; 164: 1131-39.
2. Tasheva ES, Klocke B, Conrad GW. Analysis of transcriptional regulation of the small leucine rich proteoglycans. Mol Vision 2004; 10: 758-72.
3. Goff LM, Hindson VJ, Jowitt TA, Scott PG. and Bishop PN. Characterization of opticin and evidence of stable dimerization in solution. J Biol Chem 2003; 278: 45280-87.
4. Reardon AJ, Goff LM, Briggs MD., McLeod D, Sheehan JK., Thornton DJ, et al. Identification in vitreous and molecular cloning of opticin novel member of the family of leucine-rich repeat proteins of the extracellular matrix. J Biol Chem 2000; 275: 2123–29.
5. Goff ML, Bishop PN. Focus on molecules opticin. Experiment Eye Res 2007; 85: 303-304.
6. Friedman JS, Faucher M, Hiscott P, Biron VL, Malenfant M, Turcotte P, et al. Protein localization in the human eye and genetic screen of opticin. Hum Mol Gen 2002; 11: 1333-42.
7. Hindson VJ, Gallagber JT, Halfter W, Bishop PN. Opticin binds to heparan and chondroitin sulfate proteoglycans. InvestOphthalmol Visual Sci 2005; 46: 4417-23.
8. Sanders EJ, Walter MA, Parker E, Aramburo C, Harvey S. Opticin bind retinal growth hormone in the embryonic vitreous. Invest Ophthalmol Visual Sci 2003; 44: 5404-409.

9. Friedman JS, Ducharme R, Raymond V, Walter MA. Isolation of a novel iris-specific and leucine-rich repeat protein (oculoglycan) using differential selection. Invest Ophthalmol Visual Sci 2000; 41: 2059-66.

10. Hobby P, Wyatt MK, Gan W, Bernstein S, Tomarev S, Slingsby Ch, et al. Cloning, modeling and chromosomal localization for a small leucine-rich repeat proteoglycan (SLRP) family member expressed in human eye. Mol Vision 2000; 6: 72-78.

11. Ramesh S, Bonshek RE, Bishop PN. Immunolocalisation of opticin in the human eye. Br J Ophthalmol 2004; 88: 697-702.